

УДК 616.6-089.843:612.017.1-071

DOI: 10.14427/jipai.2015.2.11

## Иммунологические механизмы активации врожденной и адаптивной систем иммунитета при аллотрансплантации

С.В. Зыблева\*, С.Л. Зыблев\*\*

\* Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, Гомель, Беларусь

\*\* Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

### Activation mechanisms of innate and adaptive immune systems in allotransplantation

S.V. Zybleva\*, S.L. Zyblev\*\*

\* The Republican Research Centre for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

\*\* Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

#### Аннотация

Авторы описывают молекулярные и клеточные процессы, сопровождающие иммунный ответ при трансплантации органов. Предложенная информация описывает один из основных этапов иммунного ответа – афферентное звено. С учетом различных исследовательских работ приводятся клинически значимые аспекты иммунологии отторжения трансплантата, получившие своё применение в области контроля над процессами отторжения, т.е. иммуносупрессивной терапии.

#### Ключевые слова

Трансплантация органов, врожденный и адаптивный иммунный ответ, афферентное звено трансплантационного иммунитета.

Пересадка почки является наиболее распространенным видом органной трансплантации и одним из эффективных методов лечения больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности (ХПН). Рентрансплантация по сравнению с лечением программным гемодиализом или перитонеальным диализом обеспечивает более полную медицинскую и социальную реабилитацию пациентов, сокращает стоимость лечения больных терминальной ХПН. В США и странах Европейского Союза ежегодно выполняется более 23 тысяч трансплантаций почки.

#### Summary

We describe the molecular and cellular processes accompanying the immune response in organ transplantation. One of the main phase of the immune response is its afferent component. Taking into account various research works there are given the clinically significant aspects of immunology of graft rejection that received its appliance in the field of control over rejection processes: immunosuppressive therapy.

#### Key words

Organ transplantation, innate and adaptive immune response, afferent component of transplantation immunity

Механизм иммунного отторжения пересаженных клеток и тканей имеет две фазы. В первой фазе (афферентной) вокруг трансплантата и сосудов наблюдается скопление иммунокомпетентных клеток (лимфоидная инфильтрация), в том числе Т-киллеров. Во второй фазе (эфферентной) происходит деструкция клеток трансплантата Т-киллерами, активируются макрофаги, естественные киллеры, антителогенез. Возникает иммунное воспаление, тромбоз кровеносных сосудов, нарушается питание трансплантата и происходит его гибель. Разрушенные ткани

утилизируются фагоцитами. В процессе реакции отторжения формируется клон Т- и В-клеток иммунной памяти. Повторная попытка пересадки тех же органов и тканей вызывает вторичный иммунный ответ, который протекает очень бурно и быстро заканчивается отторжением трансплантата.

Знание механизмов трансплантационного иммунитета, его возникновения и течения необходимо для решения одной из важнейших проблем медицины: пересадки органов и тканей. Технически трансплантационная хирургия, которая занимается пересадкой органов и тканей, в состоянии провести практически любую операцию по пересадке почти любых органов и тканей (сердце, легкие, печень, почки, сосуды, кожа и т.д.). Однако успех операции в подавляющем большинстве случаев зависит от иммунологической совместимости тканей, которая определяется HLA-антигенами.

### **Афферентное звено трансплантационного иммунитета**

#### **Врожденная иммунная система**

Клетки и медиаторы, вовлеченные в ранний, неадаптивный, антигеннеспецифический иммунный ответ, являются компонентами врожденной иммунной системы, которая обеспечивает организм человека первой линией защиты против повреждающих патогенов. Активация эндотелия вместе с индукцией некоторых растворимых белков или цитокинов (или транскрипция генов цитокинов), таких как ИЛ-6 и ИЛ-1, может быть выявлена в ранний посттрансплантационный период даже при сингенной трансплантации, при которой отсутствуют антигенные различия между донором и реципиентом и при которой не запускается антигенспецифический иммунный ответ [1, 2]. Возможно, как результат этой индукции, развивается повышение экспрессии молекул межклеточной адгезии на эндотелии сосудистой стенки и других клеток трансплантата, ранняя инфильтрация провоспалительными клетками, включая макрофаги. Данный ранний воспалительный ответ запускает также миграцию из трансплантата в окружающие ткани миелоидных (костномозговых) дендритных клеток [3, 4]. Несмотря на протекающие процессы, при сингенной трансплантации отторжение трансплантата, как правило, не происходит. Однако тяжелое первичное повреждение является центральным механизмом в стимуляции антигенспецифического иммунитета: максимальное повреждение

органа вызывает максимально “опасный” сигнал, который инициирует адаптивный, антигенспецифический иммунный ответ, проявляющийся отторжением (при наличии антигенного различия между донором и реципиентом).

#### **Рецепторы врожденной системы**

Клетки врожденной иммунной системы несут так называемые образ-распознающие или паттерн-распознающие рецепторы (PRR – pattern-recognition receptor), которые распознают и взаимодействуют с молекулами, экспрессированными патогенами (патоген-ассоциированные молекулярные образы). Макрофаги и дендритные клетки трансформируются посредством их поверхностных и внутренних паттерн-распознающих рецепторов в высокоактивные антигенпредставляющие клетки. Одной из групп образраспознающих рецепторов являются TOLL-like рецепторы (TLR). Все TLR используют одинаковую принципиальную схему передачи активационного сигнала в ядро. После связывания с лигандом рецептор привлекает один или несколько адапторов (MyD88, TIRAP, TRAM, TRIF), которые обеспечивают передачу сигнала с рецептора на каскад серин-треониновых киназ. Последние вызывают активацию факторов транскрипции NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor of  $\kappa$ -chain B-lymphocytes*), AP-1 (*Activator Protein 1*), IRF3, IRF5 и IRF7 (*Interferon Regulatory Factor*), которые транслоцируются в ядро и индуцируют экспрессию генов мишеней [5].

Имеются свидетельства, что распознающая роль данных рецепторов может быть использована в дальнейшем в экспериментальной трансплантологии. В этом процессе главным образом принимают участие TLR-4 и TLR-2, которые могут связывать как эндогенные (тканевые антигены), так и экзогенные (липополисахариды, пептидогликаны) лиганды, а также TLR-3 – уникальный рецептор, использующий MyD88-независимый сигнальный путь при распознавании mRNA, ассоциированной с некротическими клетками. Связывание вирусного патогена с мембранным Toll-рецептором (TLR-3), приводящее к развитию активации врожденного иммунитета с воспалением, также может вызывать острое или хроническое отторжение трансплантата [6].

Многие авторы задаются вопросом: почему такая явная стерильная процедура как трансплантация сопровождается активацией паттерн-распознающих рецепторов. Существует мнение, что эндогенные лиганды, высвобождаемые после повреждения тканей, также могут нести некото-

рые паттерн-распознающие рецепторы, активирующие клетки врожденной иммунной системы [7]. Антигенные различия между донором и реципиентом впоследствии могут эффективно презентироваться клеткам адаптивной иммунной системы и способствовать реализации антигенспецифических иммунных реакций.

**Другие клетки** врожденной иммунной системы вносят вклад не только в ранние этапы иммунного ответа после трансплантации (например, интерферон-гамма, продуцируемый натуральными киллерами, способствующий активации дендритных клеток), но также участвуют в поздних фазах реакции отторжения трансплантата (в т.ч. эозинофилы, которые могут быть вовлечены в тканевое повреждение трансплантата).

#### Натуральные киллеры

Натуральные киллеры (НК) не нуждаются в предварительном контакте с антигеном для осуществления своей литической функции по отношению к клеткам-мишеням (хотя их активность может повышаться в присутствии некоторых цитокинов), и таким образом, они обеспечивают первичный защитный механизм врожденного иммунитета. НК могут находиться в крови или селезенке и способны повреждать НК-чувствительные мишени (например, опухолевые клетки). Еще недавно натуральным киллерам не отводили существенную роль в солидной трансплантации, однако отмечали их принципиальное значение в пересадке костного мозга [8, 9]. Некоторые лаборатории, используя различные экспериментальные модели, демонстрируют роль НК в выживании трансплантата. Влияние натуральных киллеров на активацию центральных механизмов иммунитета осуществляется посредством их взаимодействия с дендритными клетками и продукции большого количества гамма-интерферона. В настоящее время существуют убедительные данные, демонстрирующие, что воздействие только натуральных киллеров, хотя и недостаточно, чтобы вызвать отторжение, вносит существенный вклад в данный процесс. Экспериментально показано, что у линий мышей с выключенными ко-стимуляционными сигналами (CD28<sup>-/-</sup>) удаление натуральных киллеров существенно пролонгирует выживание трансплантата [10].

Методы, используемые натуральными киллерами для распознавания клеток-мишеней, и особенности иммунного взаимодействия между эффектором и клеткой-мишенью интенсивно

изучаются и являются объектом существенного научного интереса [11, 12, 13, 14, 15, 16]. В противоположность Т-лимфоцитам, взаимодействие с молекулами главного комплекса гистосовместимости (HLA) на клетках мишенях может приводить к получению негативного сигнала натуральными киллерами, предотвращая реализацию их литической активности. Отсутствие собственных молекул HLA является триггером для НК к атаке этих мишеней, что важно в понимании иммунологических процессов, происходящих при трансплантации костного мозга, где клетки либо не несут, либо экспрессируют антигены HLA-I класса в малом количестве. Данный факт очень важен и может быть использован как стратегия иммуносупрессии – блокировки или удаления донорских молекул HLA с целью улучшения процесса приживания трансплантата.

В работах некоторых авторов были отмечены различия в репертуаре периферических НК у пациентов после трансплантации почки, изучаемых при протокольной биопсии почечного трансплантата. Авторы отметили, что нарушения в составе периферических натуральных киллеров, возможно, имеет корреляционную взаимосвязь с особенностями индивидуальных режимов иммуносупрессии, т.е. с использованием ингибиторов кальциневрина, таких как циклоsporин или такролимус с (или без) добавления mTOR ингибиторов. Присутствие донор-специфических антител ассоциировалось со снижением количества CD56dim натуральных киллеров. Более того, у пациентов с различными схемами иммуносупрессии было отмечено снижение экспрессии CD16<sup>+</sup> и CD6<sup>+</sup> на CD56dim NK со значительными отличиями в группе пациентов, использующих циклоsporин А (ЦИК-группа), и в группе, принимающих такролимус (ТАК-группа). В ТАК-группе пациентов было отмечено снижение CD69<sup>+</sup>, HLA-DR и повышение CD94/NKG2A экспрессии на CD56dim NK. В исследованиях *in vitro* была продемонстрирована возможность модуляции экспрессии CD16<sup>+</sup>, CD6<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> и HLA-DR на мононуклеарах здоровых доноров в присутствии ингибиторов кальциневрина и ингибиторов mTOR. Также присутствие данных препаратов оказывало влияние на последующую дегрануляцию и гамма-интерферон-продукцию K562 клетками (ЛАК-клетками) [17].

#### Эозинофилы

В настоящее время известно, что эпизоды острого и хронического отторжения ассоциированы с различным уровнем эозинофилов в



крови [18, 19, 20], но изучение их вклада в процесс отторжения широко не освещалось. На экспериментальных мышинных моделях отторжения сердечного трансплантата, в которых были удалены CD8+ Т-лимфоциты и, как результат, доминирование Th2-клеточного ответа, наблюдалось отторжение, ассоциированное с эозинофилами. На других моделях, в которых использовались мыши с различиями по МНС II класса антигенам, были изучены кожные трансплантаты, где была отмечена ИЛ-5-зависимая инфильтрация эозинофилами. В данной модели с отсутствием Fas/FasL взаимодействия нейтрализующие антитела к ИЛ-5 блокировали эозинофилию и, как результат действия эозинофилов, отторжение. В других экспериментах с подобными моделями продемонстрирована роль ИЛ-5 и эозинофилии в хроническом отторжении, но в этих системах вклад эозинофилов обнаруживался не при всех патологиях. В ситуациях, когда классические пути отторжения трансплантата отсутствуют или доминирует Th2-тип иммунного ответа, эозинофилы могут играть существенную роль в реакциях отторжения.

#### Комплемент

Система комплемента – это гуморальный компонент врожденного иммунитета, являющегося комплексом растворимых белков, ферментов и рецепторов, которые путем каскадных реакций осуществляют эффекторную функцию. Хотя активация системы комплемента обычна для инфекционного процесса, комплемент может также быть активирован различными эндогенными сигналами, включая гипоксию или стресс [21, 22]. Активация комплемента образует большое количество продуктов, которые важны не только в качестве повреждающих факторов, но и участвуют в регуляции воспалительных процессов [23]. Традиционно считалось, что местом синтеза компонентов комплемента является печень, однако в настоящее время известно, что существует множество других источников синтеза компонентов комплемента и комплемент-синтезирующие миелоидные клетки являются неотъемлемым компонентом осуществления адаптивного иммунного ответа [23, 24]. В трансплантации синтез С3-компонента комплемента донорским органом в экспериментальных и клинических исследованиях демонстрирует его важную роль в формировании аллоиммунитета [25, 26]. Было обнаружено, что дендритные клетки сами могут продуцировать С3-компонент комплемента и с его помощью регулировать созревание дендрит-

ных клеток и усиливать их возможности взаимодействия с Т-лимфоцитами. Дендритные клетки у С3-дефицитных линий мышей способствовали снижению Т-клеточного ответа и частично позитивно влияли на Т-регуляторную субпопуляцию лимфоцитов, которая оказывает угнетающее воздействие на иммунные реакции. В настоящее время С3-продуцирующая способность дендритных клеток является одним из центральных изучаемых аспектов в трансплантологии.

#### Афферентное звено адаптивного трансплантационного иммунитета

Антигенспецифический или адаптивный ответ на аллотрансплантат имеет две основные стадии. Первая – афферентная, во время которой происходит представление донорских антигенов Т-лимфоцитам реципиента, сопровождающееся их активацией, пролиферацией и дифференцировкой. Вторая, эффекторная, стадия сопровождается внедрением эффекторных лимфоцитов в орган, где они осуществляют повреждения, приводящие к деструкции ткани.

#### Антигены, стимулирующие отторжение аллотрансплантата

Степень гистосовместимости определяет исход трансплантации. У всех видов позвоночных различают единственный главный комплекс гистосовместимости (HLA) и множество минорных (miH). Несовместимость либо по HLA, либо по miH антигенам донора и реципиента приводит к иммунному ответу на трансплантат, хотя более сильное отторжение развивается при несовпадении по HLA. У несенсибилизированных реципиентов при HLA-совместимой трансплантации отторжение может не наблюдаться или быть отсроченным, несмотря на это существуют описанные случаи, когда у линий мышей с трансплантацией сердца наличие множественных miH-несовпадений приводило к более быстрому отторжению, чем при HLA-несовпадениях.

Антигены miH могут играть важную роль в отторжении трансплантата у реципиентов, получивших HLA-совместимый трансплантат, но у которых существовала предсуществующая сенсибилизация по miH антигенам. Данная ситуация была изучена на мышинных и крысиных моделях [27, 28] при пересадках между сибсами. Как было продемонстрировано, множественные miH различия вызывают иммунологическую стимуляцию, сопоставимую с различиями по HLA у несенсибилизированных реципиентов с сердечным трансплантатом у мышей [29], что

довольно сложно изучить в подобных ситуациях в клинической трансплантации. Также часто может отмечаться полиморфизм тканеспецифичных антигенов, что было продемонстрировано при трансплантации кожи у мышинной модели [30] и почки у крысы [31]. У крыс с несовместимостью только по почечным антигенам не происходила индукция отторжения при почечной трансплантации, даже когда реципиент был предсенсублизирован. Примером минорного антигена служит антиген, связанный с HLA I класса цепи A (MICA).

Гены MIC (MHC class I-related chain A and B) были открыты в 1994 году. Они располагаются в области HLA-B-генов I класса на 6-й хромосоме [32]. На настоящий момент открыто 7 локусов. Наиболее исследованы MICA и MICB гены, кодирующие гликопротеиды. Известно более 60 аллельных вариантов MICA и 25 – MICB. Белки, кодируемые генами MICA и MICB, обеспечивают костимуляцию естественных киллеров и Т-лимфоцитов. Эндотелиальные клетки, экспрессирующие на своей поверхности MICA, могут стать мишенью для развития как гуморального, так и клеточного иммунного ответа при отторжении аллотрансплантата, даже при условии хорошей совместимости по антигенам HLA.

### Антигенная презентация

Иммунизация антигенами главного комплекса гистосовместимости в форме растворимого мембранного экстракта или в липосомах может не вызывать иммунного ответа, тогда как HLA клеточной поверхности, является высоко иммуногенной. Презентация HLA I класса на клетках, не экспрессирующих антигены II класса (например, эритроциты грызунов и тромбоциты), не создает достаточный первичный иммунный ответ, свидетельствуя, что существует необходимость в присутствии HLA II класса для осуществления оптимального иммунного ответа. В некоторых случаях презентация несовместимых антигенов HLA I класса при отсутствии антигенов II класса, не вызывая первичный иммунный ответ, может инициировать состояние активной супрессии или толерантности.

Уровень иммуногенности HLA белков значительно варьирует и зависит от типа клеток, на которых они находятся. Клетки, имеющие свойства лейкоцитов, образующиеся в костном мозге, находятся во всех лимфоидных и не лимфоидных тканях организма. Первоначально упоминалось, что эти клетки немедленно мигрируют из тканей после трансплантации в лимфоидные органы

реципиента, где они получают возможность взаимодействовать и стимулировать иммунный ответ реципиента [3, 4]. Эти тканевые лейкоциты имеют характеристики незрелых дендритных клеток (DC<sub>1</sub>) [33], которые во время миграции быстро созревают в антигенпрезентирующие клетки, что частично способствует их возможности стимулировать Т-лимфоциты [34-36]. Зрелые дендритные клетки экспрессируют одномоментно большое количество HLA I и II класса с рядом костимулирующих белков и цитокинов и имеют возможность стимулировать CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты. Они обладают уникальным по силе стимуляционным воздействием на наивные Т-лимфоциты и, мигрируя из трансплантата, активируют адаптивный иммунитет реципиента, что дает им право называться профессиональными антигенпредставляющими клетками. Это предположение, возможно, парадоксально, так как Т-лимфоциты имеют ограничения к распознаванию пептидов в связи с ауто-HLA белками (позитивная селекция Т-клеток в тимусе). Однако то, что аллогенный комплекс белок/HLA обеспечивает уникальной силы стимул для иммунной системы и с высокой частотой (от 1% до 10%) Т-лимфоциты отвечают на собственные HLA, экспериментально доказано. Аллогенные HLA содержат пептиды, полученные из донорских тканей, возникающих главным образом из обычных неполиморфных белков [37] или аутологичных молекул HLA. В отношении ауто-HLA первоначальный тип белков не смог бы индуцировать обычное иммунное распознавание, потому что у организма была бы к ним толерантность. Когда HLA являются аллогенными (т.е. когда трансплантат находится в HLA-несовместимом реципиенте), сумма ауто-HLA плюс процессированный белок может быть распознан как чужеродный и вызвать стимуляцию Т-клеток. Реальная работа этих Т-клеток - не ответ на аллоантигены, а устранение повреждений в организме. Их возможность распознавать аллоантигены происходит вследствие кросс-реактивности их рецепторов с собственными молекулами HLA плюс чужеродные белки и с аллогенными HLA плюс собственные пептиды. Большое количество Т-лимфоцитов активируется чужеродными белками плюс ауто-HLA, что возможно обнаружить при кросс-реактивности на один и более аллоантигенов.

Также различные пептиды из подобных белков могут быть представлены чужеродными и собственными HLA ввиду различий пептидсвязывающей способности каждой бороздки

HLA. Пептиды, обычно не распознающиеся собственными HLA, не вызывают толерантность у реципиента и могут индуцировать иммунное распознавание, когда представлены на аллоантигенных HLA. Аллореактивные цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), индуцированные прямой антигенной презентацией, могут распознавать широкий спектр различных белково-HLA комплексов и не связанных HLA молекул, как продемонстрировано Rotzchke и коллегами [38]. Существует достаточно большое количество Т-клеток, которые реагируют на все представленные аллогенные HLA, потому что большое количество различных аутопептидов, полученных из трансплантата и их комбинации с аллогенной HLA, стимулирует множество различных Т-клеточных клонов реципиента.

#### Прямая антигенная презентация

У антигенпрезентирующих клеток (АПК) донора и реципиента имеет место разное генетически обусловленное строение белковых молекул HLA, на которых презентуются антигены Т-лимфоцитам. Поэтому АПК донора (лейкоциты-пассажиры) и реципиента презентуют Т-лимфоцитам реципиента разные процессированные антигенные пептиды, полученные из одних и тех же белков, все равно, донора или реципиента, так как белки внутри вида мало чем отличаются [39, 40]. Донорские АПК обеспечивают презентацию большинства аллоантигенов, процессированных из белков донора или реципиента наивным CD4 и CD8 Т-лимфоцитам реципиента, тем самым вызывая реакцию классического острого отторжения по прямому метаболическому пути. Донорские АПК живут в организме реципиента 3–6 месяцев, определяя кривую вероятности острого отторжения по прямому метаболическому пути.

#### Непрямая антигенная презентация

Элиминация из трансплантата лейкоцитов-пассажиров не упраздняет отторжение полностью, поддерживая, что существование второго пути сенсибилизации реципиента, которому необходима антигенная презентация посредством клеток, экспрессирующих молекулы HLA II класса. У человека на эндотелии постоянно присутствуют HLA антигены II класса, которые могут обеспечивать подобный путь, но также становится ясно, что чужеродные, полученные из трансплантата антигены, могут представляться иммунной системе реципиента посредством собственных DC, в процессе, именуемом не-

прямая антигенная презентация. Это процесс, при котором обычные антигены представляются хозяину на антигенпрезентирующих клетках. Из понимания об антигенном процессинге и презентации представляется вероятным, что большинство аллогенных HLA пептидов презентированы в комплексе с HLA II класса, так как это тот путь, который преимущественно контролирует экзогенные для клетки белки. Перекрестная презентация, однако, способствует презентации цитозольных протеинов в комплексе с HLA II класса. Fangmann и коллеги [41] показали, что непрямая презентация имеет практическое значение в трансплантационном распознавании. Они продемонстрировали, что пептиды антигена I класса крыс иммунизировали животных посредством непрямого пути, чем ускорили реакцию на последующий кожный трансплантат, несущий молекулы антигена I класса, от которого были получены эти пептиды.

Данная информация была подтверждена в последующих исследованиях, где кожный трансплантат от мыши, лишенной молекул класса II<sup>-/-</sup>, был трансплантирован обычной мыши. Антигенпрезентирующие клетки из данного трансплантата не могли напрямую стимулировать CD4<sup>+</sup> клетки, так как отсутствовали антигены II класса, но все же было отмечено отторжение трансплантата с участием CD4<sup>+</sup>. В этих случаях CD4<sup>+</sup> клетки предположительно были стимулированы непрямой презентацией донорских антигенов собственными HLA [42, 43, 44]. Дальнейшие эксперименты в данном направлении включали использование антигенпрезентирующих клеток от реципиента или хозяина, которые были дезактивированы генетическими манипуляциями, при которых больше не происходила экспрессия костимуляционных молекул, являющихся одним из маркеров профессиональных антигенпредставляющих клеток (B7<sup>-/-</sup> мыши). В этих работах продемонстрировано, что отсутствие B7 на донорских клетках не имеет влияния на кинетику отторжения сосудистого сердечного трансплантата. Несмотря на отсутствие подобных белков на клетках реципиента и имело неблагоприятный в итоге эффект, было отмечено более продолжительное выживание сердечных трансплантатов, экспрессирующих молекулы B7. Полученные данные подтверждают, что в мышинных моделях наличие костимуляции антигенпрезентирующих клеток реципиента намного важнее в инициации отторжения трансплантата, чем костимуляция, обеспеченная для донорских антигенпрезентирующих клеток. Это простейшая интерпретация



того, что не прямой путь распознавания играет более важную роль, чем прямая презентация. Однако возможность того, что костимуляция, обеспеченная антигенпрезентирующими клетками реципиента важнее, чем антигенная презентация и костимуляция, не учтена полностью.

Некоторые авторы долгое время придерживались мнения, подтвержденного многочисленными исследованиями, что не прямой путь антигенной презентации играет доминирующую роль в остром отторжении трансплантата. Непрямая антигенная презентация может обеспечивать длительную антигенную стимуляцию, что может приводить к хроническому отторжению [45, 46, 47], в то время как донорские DC<sub>2</sub> быстро исчезают из трансплантата и прямая антигенная презентация приобретает меньшее значение или даже прекращает существовать.

#### Полупрямая антигенная презентация

Если Т-лимфоциты хозяина стимулированы дендритными клетками реципиента посредством не прямой антигенной презентации, то ограничение (рестрикция) по HLA для эффекторных клеток будет более выражена по отношению к хозяйским HLA, чем к донорским. Проблема может возникнуть, если цитотоксические Т-клетки, предварительно стимулированные ауто-HLA и аллогенными пептидами, начинают лизировать клетки-мишени – в случае отторжения трансплантата, чужеродные трансплантированные ткани, которые не экспрессируют ауто-HLA молекулы. Эта проблема возникает, если чужеродные MHC на клетках мишенях представляются идентичными путем видоизменения чужеродной HLA подобно собственной HLA, так как Т-клетки вовлекаются в иммунный ответ, если эффекторное звено иммунитета не нуждается в рестрикции по HLA (центральная толерантность на аутоантигены) или если эффекторные клетки премированы DC<sub>2</sub> реципиента. Как последняя ситуация может возникнуть, если Т-клетки премированы ДК реципиента? Клетки могут обмениваться интактными белками в клеточной культуре, и HLA-белки, переданные в данной модели, могут стимулировать аллореактивный ответ [48, 49]. Донорские HLA, полученные DC<sub>2</sub> реципиента, могут стимулировать такие Т-клетки, которые в дальнейшем могут взаимодействовать с трансплантатом. Важность данного процесса в стимуляции аллореактивного ответа у всех животных отражена в некоторых работах [50], но вся его значимость в запуске отторжения трансплантата еще до конца не ясна.

#### Активация и типы дендритных клеток

Давно известно, что роль дендритных клеток и других антигенпредставляющих клеток заключается в активации лимфоцитов. Взаимодействие Т-лимфоцит/дендритная клетка (DC<sub>2</sub>) реципроктно, однако все более ясно, что Т-клетки контролируют созревание [51] и функциональный фенотип [52] дендритных клеток. Связывание рецепторов CD40 на DC<sub>2</sub> и CD154 (CD40-лиганд) на Т-лимфоцитах приводит к повышению экспрессии B7 белков, которые могут в дальнейшем влиять на Т-лимфоциты.

Несколько типов DC<sub>2</sub>, описанных в литературе, включают миелоидные DC<sub>2</sub>, которые образуются в лимфоидных органах, тканевые DC<sub>2</sub>, такие как клетки Лангерганса и плазмоцитоидные DC<sub>2</sub>. Эти виды дендритных клеток характеризуются не только различной экспрессией рецепторов, но и функциональными свойствами [51, 53]. Хотя роль DC<sub>2</sub> в активации иммунного ответа очевидна, возрастающий интерес к изучению данной популяции клеток обусловлен их, возможно, ключевой ролью в формировании и поддержании иммунологической толерантности.

#### Активация Т-клеточного звена реципиента

##### Локализация Т-клеточной активации

После аллотрансплантации тонкого кишечника лейкоциты реципиента, включая Т-лимфоциты, мигрируют в мезентериальные лимфатические узлы и Пейеровы бляшки трансплантата, вызывая цитокиновый ответ в течение 24 часов после трансплантации. Данная ситуация отражает обычный хоуминг этих клеток, потому что тонкий кишечник богат лимфоидными образованиями. Именно поэтому те Т-лимфоциты, которые еще не активированы, могут таковыми стать в трансплантате, насыщенном зрелыми дендритными клетками.

Наивные лимфоциты обычно рециркулируют из крови в лимфатические образования без контакта с периферическими тканями и, непонятно как, становятся активированными в трансплантате. Более ранние исследования в этой области были инициированы идеей, что наивные клетки могут в небольшом количестве рециркулировать через периферические ткани [54, 55], причем возможность активизации клеток на периферии не ясна. Действительно, у мышей, лишенных вторичных лимфоидных тканей, отторжение трансплантата не наблюдалось либо было серьезно ослаблено. В ситуации хронического воспаления в периферических тканях развивается лимфоидный неогенез или





эктопические скопления лимфоидных клеток, что может обеспечивать среду, в которой наивные клетки могут активироваться. Возможно, лимфоидный неогенез также наблюдается при трансплантации, что поддерживается исследованиями (Cose S., Bramer C., Khanna K.M., 2007), в которых при трансплантации сердца мышам были выявлены подобные лимфатические скопления при хроническом отторжении.

В процессе отторжения других трансплантированных органов (не тонкого кишечника) яснее всего то, что Т-лимфоциты активируются в регионарных или локальных лимфоидных тканях, где они при оптимальных условиях взаимодействуют с донорскими или собственными дендритными клетками. Вероятно, вклад рециркуляции наивных Т-лимфоцитов в процесс острого отторжения не очень высок, однако в отдаленный период их роль возрастает. Изучение роли рециркуляции наивных лимфоцитов в периферические ткани с возможностью индукции толерантности может быть перспективным в контексте пролонгирования выживания и нормального функционирования трансплантата.

#### Иммунный синапс

Т-лимфоцитарная активация – комплексный, центральный для трансплантационного иммунного ответа процесс. Существует множество информации посвященной изучению данного процесса и, несмотря на то, что антигенный сигнал, полученный Т-лимфоцитами посредством TCR/CD3 комплекса, абсолютно необходим для активации, Т-клетки также получают множество других сигналов через рецепторы клеточной поверхности, без которых они не смогут полноценно запустить продуктивный иммунный ответ. Становится все более ясно, что контакт между антигенпрезентирующей клеткой и Т-лимфоцитом и другими клетками иммунной системы вовлекает супрамолекулярные организации рецепторов и лигандов в микродомены или иммунные синапсы, которые демонстрируют воспроизводимые образы пар рецептор-лиганд. Например, было показано, что молекулы адгезии группируются с TCR рецепторами на поверхности лимфоцита [56]. В синапсе Т-лимфоцит/антигенпрезентирующая клетка белки HLA первоначально аккумулируются в кольцо вокруг адгезионных белков, но при взаимодействии с TCR движутся к центральному патчу [57]; данная кластеризация белков, вовлеченных в Т-клеточную активацию, является центральной для консолидации и поддержания или инициации сигнала [58].

#### Сигналы Т-клеточного рецептора

Без взаимодействия TCR с его комплементарным антигеном Т-клетки остаются в покое состоянии и могут рециркулировать через лимфоидные ткани долгие годы [59, 60]. Большинство Т-лимфоцитов несут TCR, состоящий из двух подобных альфа- и бета-цепей, которые объединены с гамма-, дельта-, ипсилон- и сигма-цепями комплекса CD3. Конфигурация TCR специфична конкретному антиген/HLA комплексу, тогда как сигма-цепи комплекса CD3 проводят сигнал активации в Т-клетку. Результатом большинства активирующихся внутриклеточных сигнальных путей является *de novo* экспрессия спектра генов, включая гены, кодирующие цитокины, и новые поверхностные рецепторы. Данные сигнальные пути хорошо изучены, описаны [61, 62, 63, 64], и используются как точки приложения иммуносупрессивных препаратов.

#### Костимуляционные сигналы

Судьба CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцита, при получении сигнала через TCR зависит от так называемых костимуляционных или вторичных сигналов. Без этих вторичных сигналов Т-клетки могут стать анергичными или не отвечающими [65, 66, 67, 68], что, возможно, приводит к предотвращению активации этих новообразованных Т-клеток [69, 70, 71]. Данный факт (лишение вторичного сигнала может приводить к регулируемому исходу для Т-лимфоцитов) имеет огромный интерес, так как следствием данной ситуации может быть предотвращение отторжения трансплантата. Большое количество поверхностных рецепторов на Т-лимфоцитах вносит свой вклад в их активацию. CD4 и CD8 молекулы взаимодействуют с HLA I класса или HLA II класса на антигенпрезентирующих клетках. CD4 и CD8 связаны с внутриклеточными белками, которые вовлечены в трансдукцию дополнительных сигналов в Т-клетке. Серия дополнительных белков на Т-клеточной поверхности, таких как CD54, CD2, CD11a/CD18 и CD5, подключается позднее, повышая аффинитет взаимодействия между Т-клеткой и АПК, однако они также участвуют в трансдукции дополнительных сигналов в Т-лимфоците.

Рецептор CD28 был первым описан как костимуляционный рецептор. Сейчас известно, что он является членом семейства подобных белков [72, 73, 74] и все еще привлекает внимание как потенциальная мишень воздействия на трансплантационный иммунитет [75, 76]. Активация проходящего через CD28 сигнала происходит в



результате связывания с одним из рецепторов семейства B7: B7-1 (CD80) или B7-2 (CD86). Эти белки экспрессируются антигенпрезентирующими клетками, такими как дендритные клетки, и легко вступают во взаимодействие с рецептором CD28 в процессе антигенной презентации. Сигналы, полученные посредством CD28 и TCR, способствуют повышению уровня метаболизма глюкозы, повышению уровня цитокинов и хемокинов, включая очень высокие уровни интерлейкина-2, устойчивость к апоптозу и длительному увеличению количества Т-лимфоцитов. Данное мощное управление активацией и пролиферацией сбалансировано активацией на Т-лимфоцитах рецепторов CTLA-4. Подобно структуре CD28, CTLA-4 ингибирует самые ранние проявления Т-клеточной активации. CTLA-4 является более аффинным для CD80 и CD86, чем CD28, и взаимодействие с CD80 инициирует появление решетчатой структуры на клеточной поверхности, состоящей из чередующихся CTLA-4 и CD80 гомодимеров [77, 78]. Данное свойство CTLA-4 может ограничивать способность CD80 взаимодействовать с CD28, объясняя, что присутствие даже небольшого количества CTLA-4 может эффективно подавлять иммунный ответ.

Потребность в CD28-сигнале для CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов во вторичном иммунном ответе и для CD8<sup>+</sup> Т-клеток не совсем ясна. Преобладает мнение, что если CD4<sup>+</sup> не были рано стимулированы антигеном (например, они стали клетками-памяти), то для их реактивации потребуются костимуляция, причем рано активированные клетки также зависят от костимуляции [79, 80]. Экспериментально может быть продемонстрировано, что в некоторых случаях вирус-реактивированные CD8<sup>+</sup> клетки не требуют ни костимуляции посредством CD28, ни CD28-зависимой помощи. [81, 82]. Однако, чтобы достигнуть этого, им может понадобиться длительная стимуляция через TCR (обеспеченная репликацией вируса) – ситуация, которая нечасто наблюдается при других вариантах иммунного ответа. Даже CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты с огромной стимуляцией посредством TCR могут избежать необходимости в CD28-опосредованной стимуляции. Это очень важно в клинической трансплантологии, где большой процент аллореактивных пулов имеет предварительную антигенную активацию как результат перекрестной реактивности с патогенными пептидами. Таким образом обеспечивается одно возможное объяснение того, что воздействие на данный костимуляционный путь менее эффективно в смягчении трансплантационного

ответа у человека, что можно было бы предсказать, исходя из исследований на грызунах.

В эксперименте у мышей с поврежденными cd28 генами отмечалось нарушение иммунного ответа, но отторжение кожного трансплантата все равно имело место, пусть и в варианте сниженной реактивности. Это, вероятно, происходит из-за множества других костимулирующих путей, которые подменяют действия CD28 [72, 74, 83]. Некоторые мыши, имея фенотипы CTLA-4<sup>-/-</sup>, погибали от лимфопролиферативных заболеваний в течение нескольких недель после рождения, демонстрируя центральную роль CTLA-4 в контрэфективности с CD28. Блокирование CD28-пути у обычных животных может оказывать эффект на генерализацию иммунного ответа и приводить к пролонгированию выживания трансплантата или развитию иммунологической толерантности [84, 85, 86].

Большинство широко используемых для этой цели реагентов являются CTLA-Ig, которые потенциально могут блокировать все CD28- и CTLA-4-B7 взаимодействия. Факт того, что CTLA-4 обеспечивает основной сигнал в реализации иммунного ответа, демонстрирует, что вряд ли это является оптимальной стратегией и необходимо стремиться к получению реагентов, которые эффективно блокируют только CD28/B7 взаимодействия (и, возможно, взаимодействия между другими лигандными парами).

Как упоминалось ранее, существует несколько других членов семейства CD28 костимуляционных белков, включая ICOS, PD-1 и BTLA [73] и другие Т-клеточные костимуляционные семейства протеинов семейства TNF/TNFR, которые включают CD27, CD134 (OX40) и CD137 (4-1BB) [86]. Лиганды этих белков распространены более широко, включая экспрессию на клетках, не играющих роли в активации наивных Т-клеток. Подобные рецепторно-лигандные пары могут быть важны в поддержании иммунного ответа и оказывать пагубное воздействие в виде развития хронического отторжения.

Действительно, обнаружено, что блокировка ICOS может редуцировать патофизиологические процессы в экспериментальной модели хронического отторжения. Судя по всему, все эти костимулирующие белки имеют антагонисты подобные CTLA-4, отражая важные представления о процессах, контролируемых иммунную систему.

При активации на Т-лимфоцитах экспрессируются и другие клеточные рецепторы, такие как CD154 (лиганд CD40). Взаимодействие этого белка с его корцептором, молекулой CD40,





является центральным моментом в активации В-клеток, дендритных клеток и моноцитов. Larsen с соавторами показали, что, заблокировав данное взаимодействие, можно пролонгировать выживаемость сердечного трансплантата на экспериментальной мышинной модели [88]. Еще более впечатляющим было то, что комбинация блокировки CD28 и CD40 взаимодействий может вызвать долговременное выживание кожного трансплантата у мышей с длительным отсутствием нарушения целостности трансплантата [89]. Толерантность к антигенам трансплантата не смогла быть показана на этих моделях, несмотря на великолепную выживаемость трансплантата.

Другие группы ученых, используя данный подход, всегда демонстрировали значительные возможности воздействия на регуляцию иммунного ответа. Отторжение почечного трансплантата у обезьян было практически полностью предотвращено использованием антител к CD154 (лиганду CD40) [90]. Подобные блокирующие антитела широко используются в клинических испытаниях. Первые антитела этого типа, которые должны были быть использованы клинически, сейчас, однако, отвергнуты в связи с наличием множества побочных эффектов.

#### Инициация иммунного ответа: CD4 и CD8 клетки

Взаимодействие Т-лимфоцита и дендритной клетки играет фундаментальную роль в инициации иммунного ответа. Следствием данного взаимодействия является пролиферация и дифференцировка Т-хелперов, сопровождающаяся продукцией факторов роста и дифференцировки (или цитокинов), которые необходимы другим клеткам для потенциальной иммунологической реакции. Во многих случаях эти Т-хелперы несут CD4 рецептор, но в определенных ситуациях CD8-клетки могут отвечать и при отсутствии Т-хелперов и сами удовлетворять всем требованиям Т-хелперных клеток [91]. Следовательно, как было показано многими авторами, Т-хелперы практически всегда требуются для инициации отторжения трансплантата [92–96], завися от наличия несовпадений между донором и реци-

пиентом, а CD8-клетки могут дополнительно нуждаться в контакте с CD4<sup>+</sup>-клетками, либо могут действовать независимо от них [97, 98, 99, 100, 101]. Исследование эффектов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>-клеток при трансплантационном ответе включает использование выключенных по каким-либо генам мышинных моделей. Мыши с потерей HLA I класса или II класса существенно теряли CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup>-лимфоциты, как и те мыши, у которых были выключены гены или *cd4*, или *cd8* [102–109]. Влияние на трансплантационный иммунный ответ снижения количества CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, таким образом, непредсказуемо и часто зависит от несовпадений между донором и реципиентом. Более того, несмотря на явное снижение CD8<sup>+</sup>-клеток у мышей HLA класса I<sup>-/-</sup>, CD8<sup>+</sup> цитотоксические клетки могут образовываться в большом количестве после трансплантации и вовлекаться в процесс отторжения [43, 102, 109].

#### Заключение

За довольно продолжительный период времени появилось много информации о взаимодействиях, происходящих при иммунном ответе на аллотрансплантат. Как известно, молекулы HLA принимают участие в различных видах иммунных реакций, однако первоначально эти молекулы были описаны как трансплантационные антигены и продолжают играть ключевую роль в данном контексте. В этапах процесса, протекающего при аллотрансплантации, основным звеном является распознавание Т-клеточным рецептором комплекса HLA-пептид. То, что каждый аллотрансплантат обладает уникальным набором антигенов, объясняет, почему так трудно разработать способы регулирования иммунного ответа при трансплантации.

Активация лимфоцитов – важный и сложный процесс, во время которого осуществляется многочисленные межмолекулярные контакты. Изучение новых вариантов этих взаимодействий определяет все новые точки приложения современной иммуносупрессивной терапии и методы неинвазивного мониторинга посттрансплантационного периода.

#### Литература

1. Dallman MJ, Larsen CP, Morris CP. Cytokine gene transcription in vascularised organ grafts-analysis using semiquantitative polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1991; 174: 493-6.

2. Tono T, Moden M, Yoshizaki K, Valdivia LA, Nakano Y, Gotoh M, Ohzato H, Doki Y, Ogata A, Kishimoto T. Biliary interleukin 6 levels as indicators of hepatic allograft rejection in rats. *Transplantation* 1992; 53: 1195-201.

3. Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM: Migration of dendritic leucocytes from cardiac allografts into host spleens: a novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med.* 1990; 171: 307-14.
4. Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M et al. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med.* 1990; 172: 1483-93.
5. Хаитов Р.М., Иммунология: структура и функции иммунной системы: уч. пос.. М: 2013; 280 с.
6. Bowie AG. Translational mini-review series on Toll-like receptors: Recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in anti-viral immunity. *Clin Exp Immunol.* 2007; 147(2): 217-26.
7. Obhrai J, Goldstein DR. The role of toll-like receptors in solid organ transplantation. *Transplantation* 2006; 81: 497-502.
8. Murphy WJ, Kumar V, Bennett M. Rejection of bone marrow allografts by mice with severe combined immune deficiency (SCID): evidence that NK cells can mediate the specificity of marrow graft rejection. *J Exp Med.* 1987; 165: 1212-7.
9. Murphy WJ, Kumar V, Bennett M: Acute rejection of murine bone marrow allografts by natural killer cells and T cells: differences in kinetics and target antigens recognized. *J Exp Med.* 1987; 166: 1499-509.
10. Kitchens WH, Uehara S, Chase CM et al. The changing role of natural killer cells in solid organ rejection and tolerance. *Transplantation* 2006; 81: 811-7.
11. Borrego F, Masilamani M, Marusina AI et al. The CD94/NKG2 family of receptors: from molecules and cells to clinical relevance. *Immunol Res.* 2006; 35: 263-78.
12. Colonna M, Brooks EG, Falco M et al. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science.* 1993; 260: 121-4.
13. Leibson PJ: MHC-recognising receptors: they're not just for T cells anymore. *Immunity* 1995; 3: 5-8.
14. Long EO, Wagtmann N. Natural killer cell receptors. *Curr Opin Immunol.* 1997; 9: 344-50.
15. Parham P. Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol.* 2005; 42: 459-62.
16. Trowsdale J, Barten R, Haude A et al. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol Rev.* 2001; 181: 20-38.
17. Neudoerfl C, Mueller BJ, Blume C et al. The peripheral NK cell repertoire after kidney transplantation is modulated by different immunosuppressive drugs. *Front Immunol.* 2013; 4: 46. doi: 10.3389/fimmu.2013.00046.
18. Foster P, Sankary HN, Hart M. Blood and graft eosinophilia as predictors of rejection in human liver transplantation. *Transplantation* 1989; 47: 72-4.
19. Kormendi F, Amend WJC, The importance of eosinophil cells in kidney allograft rejection. *Transplantation* 1988; 45: 537-9.
20. Nolan CR, Saenz KP, Thomas CA et al. Role of eosinophils in chronic vascular rejection in renal allografts. *Am J Kidney Dis.* 1995; 26: 634-42.
21. Walport MJ. Complement: first of two parts. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1058-66.
22. Walport MJ. Complement: second of two parts. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1140-4.
23. Carroll MC. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2004; 5: 981-6.
24. Verschoor A, Brockman MA, Knipe DM et al. Cutting edge: myeloid complement C3 enhances the humoral response to peripheral viral infection. *J Immunol.* 2001; 167: 2446-51.
25. Verschoor A, Brockman MA, Gadjeva M et al. Myeloid C3 determines induction of humoral responses to peripheral herpes simplex virus infection. *J Immunol.* 2003; 171: 5363-71.
26. Pratt JR, Basheer SA, Sacks SH. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat Med.* 2002; 8: 582-7.
27. Fabre JW, Morris PJ. Studies on the specific suppression of renal allograft rejection in presensitized rats. *Transplantation* 1975; 19: 121-33.
28. Peugh WN, Superina RA, Wood KJ et al. The role of H-2 and non-H-2 antigens and genes in the rejection of murine cardiac allografts. *Immunogenetics.* 1986; 23: 30-7.
29. Rabinovitch A, Pukel C, Baquerizo H. Interleukin-1 inhibits glucose-modulated insulin and glucagon secretion in rat islet monolayer cultures. *Endocrinology* 1881; 22: 2393-8.
30. Steinmuller D, Wachtal SS. Passenger leukocytes and induction of allograft immunity. *Transplant Proc.* 1980; 12: 100-6.
31. Morales-Buenrostro L-E, Rodriguez-Romo R, de Leo Cervantes C et al. HLA and MICA antibodies: further evidence of their impact on graft loss two years after their detection. *Clin Transpl.* 2006; 207-18.
32. Harshyne LA, Watkins SC, Gambotto A et al. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol.* 2001; 166: 3717-23.
33. Reis e Sousa C, Stahl PD, Austyn JM: Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* 178:509-519, 1993.
34. Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leucocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978; 75: 5132-6.
35. Steinman RM, Gutchinov B, Witmer MD et al. Dendritic cells are the peripheral stimulators of the primary mixed leucocyte reaction in mice. *J Exp Med.* 1983; 157: 613-27.
36. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 1991; 9: 271-96.
37. Rotzschke O, Falk K, Faath S et al. On the nature of peptides involved in T cell alloreactivity. *J Exp Med.* 1991; 174: 1059-71.
38. Mullally A, Ritz J. Beyond HLA: the significance of genomic variation for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2007; 109(4): 1355-62.
39. Keller MR, Burlingham WJ. Loss of tolerance to self after transplantat. *Semin Immunopathol.* 2011; 33(2): 105-10.
40. Fangmann J, Dalchau R, Fabre JW. Rejection of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides. *J Exp Med.* 1992; 175: 1521-9.
41. Auchincloss H, Lee R, Shea S et al. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 3373-77.
42. Lee RS, Grusby MJ, Glimcher LHH et al. Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J Exp Med.* 1994; 179(3): 865-72.
43. Lee RS, Grusby MJ, Laufer TM et al. CD8+ effector cells responding to residual class I antigens, with help from CD4+ cells stimulated indirectly cause rejection of "major histocompatibility complex-deficient" skin grafts. *Transplantation* 1997; 63:1123-33.
44. Cramer DV, Qian S, Harnaha J et al. Cardiac transplantation in the rat. I: the effect of histocompatibility differences on graft arteriosclerosis. *Transplantation* 1989; 47:414-9.
45. Shirwan H. Chronic allograft rejection: do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role? *Transplantation* 1999; 68: 715-26.
46. Yamada A, Laufer TM, Gerth AJ et al. Further analysis of the T-cell subsets and pathways of murine cardiac allograft rejection. *Am J Transplant.* 2003; 3: 23-7.